

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

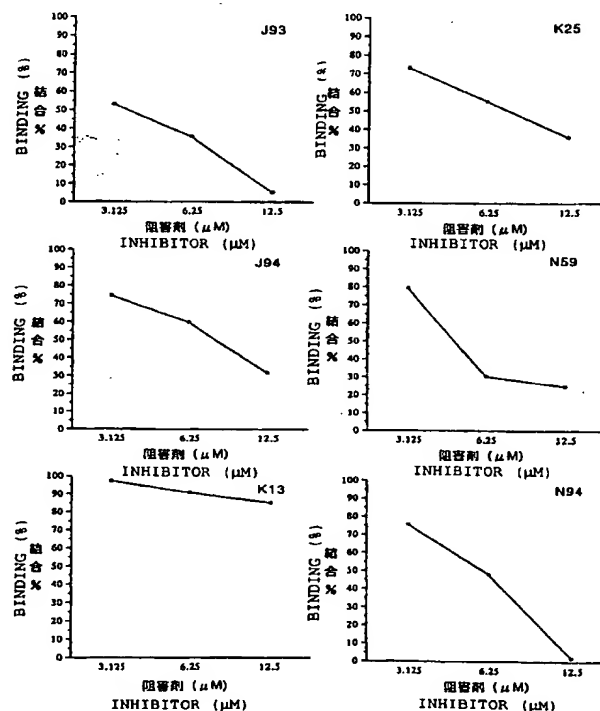
<p>(51) 国際特許分類7 C12N 15/09, C12Q 1/00, C07K 4/00, C12Q 1/02, 1/70</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/53740</p> <p>(43) 国際公開日 2000年9月14日(14.09.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01478</p> <p>(22) 国際出願日 2000年3月10日(10.03.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/63110 1999年3月10日(10.03.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)[JP/JP] 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 岡元 訓(OKAMOTO, Satoru)[JP/JP] 三輪清志(MIWA, Kiyoshi)[JP/JP] 江藤 譲(ETO, Yuzuru)[JP/JP] 〒210-0801 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 医薬研究所内 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>

(54)Title: METHOD FOR SCREENING BIOMOLECULE ACTIVITY REGULATOR

(54)発明の名称 生体分子の活性調節物質のスクリーニング法

(57) Abstract

A method for screening a low molecular weight substance which binds to a specific site of a biomolecule and thus may be usable as a starting material in developing drugs. This method comprises screening a substance which undergoes an interaction with a specific area of a biomolecule having an activity to thereby regulate the activity through the following steps: (a) the step of selecting a recombinant undergoing an interaction with the above-described biomolecule from a peptide library consisting of recombinants each presenting at least one of various peptides on the surface; and (b) the step of selecting a substance inhibiting the interaction between the recombinant thus selected or the peptide presented by this recombinant and the above biomolecule.



生体分子の特定の部位に結合し、医薬品開発の出発材料となり得る低分子物質をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、以下の工程によって、活性を有する生体分子の特定の領域に相互作用することによってその活性を調節する物質をスクリーニングすることを含む。

(a) 多様なペプチドのうちの少なくとも一つを表面に提示する組換え生物の集合体からなるペプチドライブラリーから、前記生体分子と相互作用する組換え生物を選択する工程、及び

(b) 選択された組換え生物又は該組換え生物が提示するペプチドと、前記生体分子との相互作用を阻害する物質を選択する工程。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明細書

## 生体分子の活性調節物質のスクリーニング法

## 技術分野

本発明は、生体分子の活性を調節する物質をスクリーニングする方法に関し、詳しくは、例えば医薬品の出発材料となり得る化合物のスクリーニングに有用な方法を提供するものである。

## 背景技術

医薬品開発の出発材料となるリード化合物のスクリーニングは、微生物の作り出す二次代謝産物や、既知の分子構造を参考にして化学合成した低分子の化合物を、試験管内でアッセイすることや、レポーター遺伝子等を組み込んだ細胞を用いて評価することにより行われてきた。最近では、メカトロニクス技術を医薬品のスクリーニングに応用し、上記のアッセイシステムを自動的に短時間で行うハイスループット・スクリーニング、および多種多様な化合物の合成を自動的に行うコンビナトリアル・ケミストリーの手法を組み合わせることにより、製薬会社において大規模なランダムスクリーニングが開始されている。

近年、ランダムなアミノ酸配列を発現提示させた生物の集合体、すなわちペプチドライブラリーを構築し、このライブラリーから特定分子と結合可能な配列を選択する方法が知られている。このようなライブラリーとして、繊維状ファージの外殻蛋白質を用いたファージディスプレイ・ランダムペプチドライブラリー(Scott, JKら、Science, Vol. 249, 386-390, 1990)が報告されている。これらの生物を用いたライブラリーや、固相担体上に作製した化学合成ライブラリー(Lam, KSら、Nature, Vol. 354, 82, 1991)は、医薬品のペプチドリード化合物を発見する手段として確立している。例えば、前者のファージディスプレイ・ランダムペプチドライブラリーは、ホルモンミミックペプチド(Wrighton, NCら、Science, Vol. 273, 458, 1996およびCwirla, SEら、Science, Vol. 276, 1696, 1997)、レセプター・リガンド結合阻害剤(Martens, CLら、J. Biol. Chem., Vol. 270, 21129,

1995)等、医薬品開発において有用なペプチドリード化合物の発見に用いられている。

しかしながら、ペプチドライブラリーより見いだされたペプチドはアミノ酸の付加や置換等により、さらに低い用量でも効果を持つように生物活性を向上させることは可能であるが、そのままのペプチドを治療薬とした場合には以下のような様々な問題が予測される。例えば、生体内での代謝が早くバイオアベイラビリティが低いこと、溶解性に乏しく薬剤としての投与条件が限定されること、あるいは比較的分子量が大きいため免疫系に認識されやすいことなどが、問題となる場合が少なくない。即ちペプチドのままではヒトでの薬理作用が低いことが容易に予想され、医薬品として開発することは極めて困難と言える。また以前からこれらの問題点を克服すべく、ペプチドの立体構造を模倣する非ペプチド性の低分子の化合物でペプチドを置き換えるなどの試みも行われているが、技術的に非常に難しく、実際に医薬品となった成功例は報告されていない。

一方、標的上の生物学的に活性な部位の少なくとも1つの決定基に結合することができるリガンドを同定する方法として、多様性の抗体ライブラリーから選択されるレポーター抗体を用いる方法が知られている（特表平10-507517号）。この方法は、特定の蛋白質に結合することを指標にしてファージライブラリーから選択された抗体の可変領域を用いて目的物質（リガンド）のスクリーニングを行うものである。抗原蛋白質と抗体蛋白質との結合領域の面積の大きさは広いので、結合アフィニティーも相当強い。従ってこの抗体提示ファージをプローブとして用い、分子量が平均数百ダルトンと小さい化合物ライブラリーから、標的蛋白質への結合阻害度を指標にして活性物質をスクリーニングした場合、単独で非常に強力に相互作用できる物質でなければ競合物質として発見できないことが大いに危惧される。また抗体分子の特性として蛋白質の複雑な構造を認識することから、その蛋白質の機能と何等関係のない領域に結合するものが選択されてくる可能性が高いことも容易に予想される。

#### 発明の開示

本発明は、上記現状に鑑みなされたものであり、生体分子の特定の部位に結合

し、医薬品開発の出発材料となり得る物質であって、上記問題点を持たない低分子化合物をスクリーニングする方法を提供することを課題とする。

上記課題を解決するために、本発明者らは、リード化合物のスクリーニングに、比較的長さの短いランダムペプチドを提示するファージを選択した。すなわち、一般的な医薬品のもつ分子量（数百程度）に近いペプチドは、生体分子同士の相互作用に関与している機能領域のさらに限定された領域（ホットスポット）を探索するのにより適切であると考えた。つまり、ファージ提示ペプチドはファージ提示抗体に比べて、結合アフィニティーが数百倍から数十倍低い（マイクロモル（ $\mu\text{M}$ ）オーダー）ことから、これをプローブとしてスクリーニングした場合、多種多様の小さな分子量の生体分子活性調節物質を探す上で有利であると考えた。さらに、低分子のペプチドと生体分子との結合は、その生体分子の機能と何等関係のない領域に結合するものが選択されてくる可能性が抗体分子に比べて低いことも予想された。

ファージディスプレイ・ランダムペプチドライブラリーに代表される、分子間相互作用を指標としたペプチド化合物の選択手法は、蛋白質相互作用を阻害するペプチド分子やサイトカイン活性を模倣するペプチド分子の発見に有用であることが示されている。また一般的に、蛋白質間の相互作用、例えば蛋白質分解酵素による基質蛋白質の切断反応、リン酸化酵素による特異的な基質分子のリン酸化、細胞表面に存在するレセプターとリガンドの結合等はそれら蛋白質の表面に露出、局在している特徴的なアミノ酸残基、具体的には正電荷・負電荷の側鎖や、疎水性の側鎖を有するアミノ酸より担われている。本発明らがファージディスプレイ・ランダムペプチドライブラリーを用いて行ってきた様々な検討の結果から、ファージディスプレイ・ランダムペプチドライブラリーから選択されてきた、ある特定の蛋白質に結合する能力を有するペプチドは、その蛋白質の有する重要な機能領域に相互作用している可能性が高く、これらペプチドを同定することは蛋白質の機能領域を探すことに等しいことを見いだした。

一方、ヒトC型肝炎ウイルス（以下、「HCV」と略す）のゲノムにコードされるセリンプロテアーゼ、非構造蛋白質3（以下、「NS3プロテアーゼ」と略す）、またはcpro-2は、ウイルスの増殖に重要な働きをしていることが明らかであり

(Patick, A.K. et al., Clinical Microbiology Reviews, 11(4), 614-627 (1998)等を参照)、このNS3プロテアーゼの活性を阻害する薬剤はHCVの感染、増殖を原因とする種々の肝臓の疾患、例えば肝硬変や肝臓ガンの予防や治療に有効であると考えられていることから、世界中で薬剤の探索が行われているが、未だ有望な薬剤の発見に至っていない。我々はこのNS3プロテアーゼの阻害剤探索を進めている過程で、上記着想を得た。そして、ファージランダムペプチドライブラリーからNS3プロテアーゼに親和性を有するファージクローンを複数見いだした。また、該オリゴペプチドがNS3プロテアーゼの基質切断反応を阻害することを見いだした。さらにNS3プロテアーゼと該オリゴペプチドを発現提示するファージの結合を検出するELISAシステムにより、これらの結合を阻害する薬剤をケミカルライブラリーより見だし、この薬剤がNS3プロテアーゼ活性を阻害できることを示した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、活性を有する生体分子の特定の領域に相互作用することによってその活性を調節する物質をスクリーニングする方法であって、以下の工程を含む方法を提供する。

(a) 多様なペプチドのうちの少なくとも一つを表面に提示する組換え生物の集合体からなるペプチドライブラリーから、前記生体分子に相互作用する組換え生物を選択する工程（但し、前記相互作用が抗原-抗体反応であるものを除く）、及び

(b) 選択された組換え生物又は該組換え生物が提示するペプチドと、前記生体分子との相互作用を阻害する物質を選択する工程。

本発明の好ましい態様においては、前記生体分子は、蛋白質、核酸又は糖鎖である。

本発明の好ましい態様においては、前記ペプチドライブラリーは、ランダムペプチド提示ファージ、又は、ランダムペプチド提示大腸菌である。

本発明の好ましい態様においては、前記ペプチドは3～15残基の長さである。

本発明の好ましい態様においては、前記選択された組換え生物又は該組換え生物が提示するペプチドは、標識物質で標識される。

本発明により選択される物質は、蛋白質、核酸及び糖鎖などの生体分子の特定

の領域に相互作用することによってその活性を調節することができるので、低分子量の医薬品のリード化合物として用いることができる。

本発明において「相互作用」とは、生体内の分子がそれらの機能を果たすために他の生体分子に接近し、互いに何らかの変化をもたらすことをいう。また、「生体分子の活性を調節する」とは、生体分子の活性を減少もしくは消失させること、又は増加させること、あるいは生体分子の活性化又は不活性化を減少もしくは消失させること、又は増加させることも含まれる。

本発明者らは、ファージペプチドライブラリーを用いた標的蛋白質に結合するペプチドのスクリーニング結果から、選択されるペプチドは標的蛋白質の機能に関係する領域に結合するペプチドがほとんどで、無意味な結合で選択されてくるものは少ない、ということを発見した。例えば、抗体のエピトープペプチドを選択する目的で、IgG蛋白質を用いてファージペプチドライブラリーをスクリーニングすると、エピトープとして認識されて選択されてくるペプチド配列の他に、IgG蛋白質のFc領域、つまりFcレセプター結合部位や補体蛋白質の結合部位など、別の機能に関係する領域に特異的に結合するペプチド配列も選択されてきた。

また、大腸菌での安定な大量発現と簡便なアフィニティー精製が可能なために、よく利用されているタグ蛋白質としてマルトース結合蛋白質(MBP)があるが、これとの融合蛋白質を用いて結合ペプチドの選択を行うと、融合した蛋白質に特異的結合するペプチドと同時に、MBPに特異的に結合するペプチド配列も選択されてきた。即ちファージペプチドライブラリーから特定の蛋白質に結合するペプチドを選択することは、その蛋白質の機能ドメインに結合するペプチドを探すことに他ならない、ということである。

蛋白質がレセプターであれば、細胞外のリガンド結合部位や細胞内のシグナル伝達部位に結合するペプチドが選択され、また蛋白質がリガンドであれば、レセプター結合部位や二量体形成部位に結合するペプチドが選択される。蛋白質が酵素であれば基質認識部位や活性化因子の結合する部位に結合するペプチドが選択され、転写因子であれば、DNA結合部位やリガンド認識部位や他の転写因子との相互作用に関係する部位に結合するペプチドが取れてくる可能性が我々の結果から推測される。

本発明の方法を適用する生体分子として具体的には、HCVのNS3プロテアーゼ、インテグリン、マトリックスメタロプロテアーゼ、セレクチン等が挙げられる。

上記のように、ペプチドライブラリーから選択される生体分子に相互作用するペプチドは、該生体分子の機能に関係する領域に結合する。したがって、このようなペプチドと生体分子との相互作用を阻害する物質もまた、該生体分子に相互作用し、その機能に関係する領域に結合する可能性が極めて高く、該生体分子の機能（活性）を調節することができることが強く示唆される。

本発明者らは、蛋白質の特定の領域（機能領域）に結合するペプチドをサロゲート（Surrogate）ペプチドと命名した。すなわち、我々が提供する手法は、第一段階として、多種多様な分子からなるライブラリー、例えばファージランダムペプチドライブラリーを用いて、蛋白質の機能領域に結合するペプチド分子、すなわちサロゲートペプチドを提示しているファージを発見し、第二段階として、その蛋白質とサロゲートファージの相互作用を阻害する化合物を種々の化合物ライブラリーより選択する。そして任意選択の第三段階として、選択されてきた化合物の生化学的活性、すなわち酵素阻害あるいは蛋白質結合阻害活性を適切なアッセイにてその生化学的に評価する。以上の手法を用いることにより、蛋白質間相互作用を調節する活性を有する化合物を効率的に選択する手法を提供することが可能である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明により選択されたペプチドを有する12種類のファージクローンのMBP-NS34aに対する親和性をELISA法で測定した結果を示す図である。

図2は、本発明により選択されたペプチドを有するファージのMBP-NS34aへの結合に対するNS4aペプチドの添加の影響をファージELISA法で測定した結果を示す。ファージペプチドK13は濃度依存的に結合が阻害された。

図3は、プロテアーゼ阻害剤HCP1271による各種ファージのNS34a結合への影響をファージELISA法により測定した結果を示す図である。ファージペプチドK13以外は濃度依存的に阻害された。

図4は、プロテアーゼ阻害剤HCP1231による各種ファージのNS34a結合への影響



をファージELISA法により測定した結果を示す図である。いずれのクローンの結合も阻害しないことを示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明に用いるためのペプチド又はペプチドを提示する生物としては、例えばランダムペプチド提示ファージ又はランダムペプチド提示大腸菌が挙げられる。ランダムペプチド提示ファージを得るためには、例えば以下に述べるファージランダムペプチドライブラリー法があげられる。ファージランダムペプチドライブラリーの種類及び調製方法は特に限定されず、公知の方法（西徹ら、実験医学、Vol.11, No.13, pp.1759-1764）で作製したものを用いればよいが、市販のファージランダムペプチドライブラリー、例えば、Ph.D Phage Display System（New England Biolabs社製）などを購入して用いてもよい。ファージランダムペプチドライブラリーを構築する方法として具体的には、例えば、M13系ファージの外殻蛋白質（例えばgeneIII蛋白質）のN末端側遺伝子に6から15個程度のアミノ酸をコードするランダム合成遺伝子を連結し、これを含むファージDNAを用いてファージ粒子を調製すれば良い。その方法としてはScott, JK. and Smith, GP., Science, Vol. 249, 386, 1990,や、Cwirla, SE.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 87, 6378, 1990等の報告がある。ファージDNAとしては、ファージ粒子を形成することができるものであれば特に制限されないが、ファージミドベクターが好ましい。

ファージランダムペプチドライブラリーの作製に際し、ファージに提示させるペプチドは、3～15残基の長さであることが好ましい。また、ファージに提示させるペプチドは、ファージ粒子表層蛋白から直接提示されるものであってもよいし、適当な長さのスペーサーを介して提示されるものであってもよい。スペーサーの配列としては、例えばGGGS（配列番号20）のように蛋白質の提示がうまくいくことが分かっているアミノ酸配列、あるいは抗体エピトープ配列のようにエピトープとしての機能とスペーサーとしての機能を併せ持つペプチド配列が挙げられる。

また、ランダムペプチド提示大腸菌ライブラリーとしては、大腸菌のべん毛の

構成蛋白質であるフラジェリン蛋白質の表層にランダムなペプチドが提示されるライブラリーがInvitrogen社より市販されており、利用可能である。大腸菌に提示させるペプチドは、3～15残基の長さであることが好ましい。

以下、目的とする生体分子が主としてNS3プロテアーゼである場合について説明するが、本発明における生体分子はNS3プロテアーゼに限定されるものではない。本発明を他の生体分子に適用する場合には、以下の記載において、NS3プロテアーゼ及びそれに関連する事項を、目的の生体分子に置き換えればよい。また、以下の説明は、ペプチドライブラリーとして、ランダムペプチド提示ファージを用いた場合についてのものであるが、本発明におけるペプチドライブラリーはランダムペプチド提示ファージに限定されるものではない。

まず、目的のNS3プロテアーゼに結合するファージを選択するためには、NS3プロテアーゼを例えばチューブやプレートに吸着させ、上記のライブラリーをNS3プロテアーゼに接触させ、結合したファージを残し、非結合ファージを洗浄により洗い落とす。洗浄後、残ったファージをpH2程度の酸溶液などで溶出した後、溶出液のpHを中性にし、大腸菌に感染させファージを増幅する。この選択過程を複数回繰り返すことにより、目的のNS3プロテアーゼに親和性を有する複数のファージが濃縮される。ここで単一なクローンを得るために、再度大腸菌に感染させた状態で寒天培地上にコロニーを形成させる。それぞれのコロニーを液体培地で培養した後、培地上清中に存在するファージをポリエチレングリコール等で沈殿精製し、得られたファージからDNAを調製し、その塩基配列を解析すればペプチドの構造を知ることができる。

ランダムなアミノ酸配列を有するペプチドライブラリーの作製方法としては、上記の様なファージを用いる方法の他、化学合成したペプチドを用いることも可能である。その方法として例えば、ビーズを用いる方法 (Lam, KSら、Nature, Vol. 354, 82, 1991)、液相フォーカシング法 (Houghton, RAら、Nature, Vol. 354, 84, 1991)、マイクロプレート法 (Fodor, SPAら、Science, Vol. 251, 767, 1991) などが報告されている。ペプチド合成におけるアミノ基等の保護基および縮合反応の縮合剤としては、例えば：鈴木絃一編「タンパク質工学－基礎と応用」(1992年、丸善株式会社)；ボンダンスキーら著「ペプタイド・シンセシス」

(1976年, John Wiley & Sons, N.Y.) ; 及びスチュワートら著「ソリッド・フェーズ・ペプチド・シンセシス」(1969年, W.H. Freeman and Co., San Francisco) 等に記載されたものを用いることができる。固相法では市販の各種ペプチド合成装置を利用することができる。

本発明に用いるためのペプチドの製造方法は上記の化学的手法及び生物学的手法に限定されることはない。

得られたペプチドがNS3プロテアーゼ活性を阻害するかを評価するためには、例えばNS3プロテアーゼが基質として切断することができるペプチドを組換え法、あるいは化学合成法により作製し、蛍光、ラジオアイソトープ等を用いて標識し、評価対象のペプチドの存在下でNS3プロテアーゼと混合させ、反応後の基質の切断を液体クロマトグラフィーや電気泳動後、オートラジオグラフィーにより、評価対象のペプチドを加えない場合に比べてどのくらい基質の切断が阻害されるかで調べることができる。

具体的には、HCVゲノムがコードするポリプロテイン上のアミノ酸配列(985番目から1647番目)をコードする遺伝子を発現させ、得られるNS3プロテアーゼを用い、垣内らの方法(Biochem. Biophys. Res. Commun., 210, 1059 (1995))に従い、基質の切断を液体クロマトグラフィーで検出すればよい。

また、NS3プロテアーゼに対して親和性を有するファージのスクリーニングは、G. P. Smith らの方法(G. P. Smith ら、Methods in Enzymology, Volume 217, pp.228-257)で行うこともできる。すなわち、上記の通りNS3プロテアーゼをコードする遺伝子を発現させて得られるNS3プロテアーゼの触媒ドメインを含む蛋白質をマイクロタイター平板ウェルプレートに固定し、このNS3プロテアーゼに結合したファージを検出すればよい。

より詳細に説明すると、HCVゲノム配列の情報に基づいて、NS3プロテアーゼの触媒ドメイン(触媒領域蛋白質)をコードするDNAを取得する。PCR(Polymerase Chain Reaction)法によれば、所望のDNAを容易に取得できる。その際、該蛋白質のN末端やC末端側に精製の簡便化のために特定の蛋白質を融合させることが好ましい。このような蛋白質としてマルトース結合蛋白質(MBP)などを挙げることができる。

例えば、NS3プロテアーゼはヒトC型肝炎ウイルス感染者で発現しているので、NS3プロテアーゼ活性を有する領域をコードするアミノ酸配列に基づいたセンス鎖オリゴヌクレオチドプライマーとアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドプライマーとを作製し、これらのプライマーを用いて、感染者由来の試料から調製したcDNAを鋳型としてPCRを行うことによってNS3プロテアーゼの触媒領域蛋白質をコードするDNAを増幅することができる。あるいは、DNAを化学的に全合成することによっても入手可能である。また、例えばMBPを付加する場合には、MBPをコードするDNAのアンチセンスDNAをNS3プロテアーゼ触媒領域蛋白質のセンスプライマーに読み枠が一致するように連結したプライマーを用いればよい。

この様にして、NS3プロテアーゼの触媒ドメインをコードするDNA断片、例えばMBPと融合したNS3プロテアーゼ触媒領域蛋白質（以下、本明細書において「MBP-NS34a」と略記する場合がある）をコードするDNA断片を取得し、ベクター中にそのDNA断片を組み込んで該DNA発現用の組換えベクターを製造することができる。ベクターの種類は、該DNAを動物細胞、植物細胞、又は微生物細胞などにおいて発現させることができるものであれば特に限定されない。MBPとの融合蛋白質は、市販のキット（例えばProtein Fusion and Purification System, New England Biolabs社製）を用い、キット添付のプロトコールに従い、目的蛋白質の発現を行うことにより、著量の蛋白質を得ることが可能である。

得られた培養物中の発現蛋白質、好ましくはMBP-NS34a は、該蛋白質に対して親和性を有するリガンドを固定した担体を用いたカラムクロマトグラフィーなどを用いて分離・精製することが可能である。MBP-NS34aの場合には、アミロースを固定した担体、例えばアミロースレジン(New England Biolabs社製) などを用いたカラムクロマトグラフィーにより、発現した蛋白質を容易に精製することができる。ついで、このようにして発現させた蛋白質をマイクロタイター平板のウェル内に固定すればよい。

固定したMBP-NS34aなどを用いて該蛋白質に特異的に結合するファージクローンを選択する方法としては、例えば G. P. Smithらの方法 (G. P. Smithら、Methods in Enzymology, Vol.217, pp.228-257) を挙げることができる。例えば、ファージペプチドライブラリーをマイクロタイター平板ウェルに固定したMBP-NS

34aに加えて室温でインキュベートした後、よく洗浄して非特異的に結合したファージを除き、ついで、固定したMBP-NS34aに結合したファージを強酸を用いて溶出することができる。このファージをアルカリで中和した後、大腸菌に感染させることによってMBP-NS34aに特異的に結合するファージクローンを増幅させることができる。

この感染大腸菌にM13K07ヘルパーファージを感染後、終夜培養した培養上清から、ポリエチレングリコール沈殿によりファージを取得することが可能である。この増幅したファージを用いて同様のスクリーニングを繰り返すことにより、例えばMBP-NS34aと強い結合を示すファージを濃縮することができる。

上記方法で得られたアンピシリンプレート上の大腸菌コロニーを培養し、M13K07等のヘルパーファージを感染させることにより、例えばMBP-NS34aに結合する可能性のあるファージを容易に調製することができる。例えば、アンピシリンプレート上の大腸菌コロニーを培養し、M13K07等のヘルパーファージを感染後、終夜培養し、その培養液を遠心し、その上清をポリエチレングリコール沈殿に付することによりファージを調製できる。得られたファージクローンが例えばMBP-NS34aに結合するか否かは、このファージを認識する抗体を利用したELISA法により判定することができる。例えば、HRP/Anti-M13 conjugate (アマシャムファルマシア社製)を用いて、最終的にMBP-NS34aに親和性を持つペプチドをコードしているファージクローンを得ることができる。

このようにしてMBP-NS34aへの結合が確認できたファージクローンからFlexi Prep Plasmid extraction Kit (アマシャムファルマシア社製)等を用いて選別されたファージ由来の二本鎖DNAを取得できる。例えばMBP-NS34aに結合することが確認できたファージDNAから、例えばサンガーらの方法 (Sanger, F.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977) によってランダムDNA領域を決定することができる。このDNA領域の配列より、ファージクローンが特異的に提示するアミノ酸配列を容易に推定することができる。

なお、本明細書に記載されているファージ、DNA、組換え体宿主としての大腸菌の取り扱いに必要な一般的な操作は当業者に周知であり、例えば、Maniatisらの実験書 (T. Maniatisら、Molecular cloning A Laboratory Manual, Cold

Spring Harbor Laboratory, 1989)に記載されている。使用する酵素、試薬類は全て市販の製品を用いることができ、通常は、製品で指定された条件に従えば完全にそれらの目的を達成することができる。本発明に用いるためのペプチドを生物学的手法に従って製造する方法については、上記の一般的な説明に加えて、本明細書の実施例に具体的かつ詳細に説明されているが、本発明に用いるためのペプチドを生物学的手法に従って製造する方法はこれらに限定されることはない。

上記のアミノ酸配列により特定されるペプチドをコードするDNAを用いて、アミノ酸配列において1又は2以上のアミノ酸残基による置換、挿入、及び／又は欠失が存在するペプチドを容易に製造することが可能である。例えば、上記のDNAを含む組換えベクターを導入した大腸菌などの形質転換体をN-ニトロ-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンなどの薬剤を用いて突然変異処理し、菌体から遺伝子DNAを回収することによって得ることができる。また、前記DNAを亜硝酸ナトリウム等の薬剤で直接処理してもよい。さらに、例えば、部位特異的変異法 (Kramer, W. and Frits, H.J., Methods in Enzymology, 154, 350, 1987)、「PCR実験マニュアル」(1991年, HJB 出版局)第155～160頁に記載されているリコンビナントPCR法、「実験医学増刊 Vol.8, No.9」(1990年, 羊土社)第63～67頁に記載されたPCRを用いた変異遺伝子の作成法などを利用することができる。

上記のようにして得られるファージペプチドを用いて、NS3プロテアーゼとペプチドとの相互作用を阻害する物質、つまりNS3プロテアーゼと相互作用する物質をスクリーニングすることができる。すなわち、NS3プロテアーゼを、例えば96穴マルチタイタープレート等に固相化し、適当に調製した様々な化合物とファージペプチドとをプレートの各ウェルに加えてインキュベートし、洗浄し、各ウェルに残ったファージの量を、例えば西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗M13抗体で検出することにより、ファージペプチドとNS3プロテアーゼとの結合を阻害する化合物を特定することが可能である。或いはファージペプチドをあらかじめ、ユーロピウム等のランタニド化合物で標識しておけば、操作上簡便であり、本発明における多種類の化合物のハイスループットスクリーニングに適している。また、ファージペプチドを標識物質で直接標識してもよい。

このように、本発明においては、組換え生物又はそれが提示するペプチドを標

識物質で標識することが好ましい。標識の様式は、直接標識でもよいし、標識物質で直接標識されかつ組換え生物を特異的に認識する物質を結合させることなどによる間接標識でもよい。また、標的の生体分子を標識することもできる。

標識物質としては、ラジオアイソトープ、蛍光物質、酵素、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ユーロピウム等のランタニド化合物等が挙げられる。ラジオアイソトープとしては $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 等が挙げられる。蛍光物質としてはFITC、TRITC、DTAF等が、酵素としてはペルオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ等が挙げられる。これらの標識物質を用いる標識及び検出は、当業者によく知られた通常のELISA法に用いられる方法を採用することができる。

上記のようにして選択された、目的とする生体分子とサロゲートペプチドとの相互作用を阻害する物質について、該生体分子の活性を調節することができることが確認されれば、該物質は医薬品開発の出発材料となるリード化合物となり得る。

本発明により選択される物質は、様々な手法を用いて改変することによって、より高い生物活性を有する物質にすることが可能である。

NS3プロテアーゼに結合するペプチドとして具体的には、実施例で得られた配列番号1～12に示されるアミノ酸配列により特定されるペプチド、又は該アミノ酸配列中に含まれる2個のシステイン残基がジスルフィド結合した環状構造のペプチドが挙げられる。上記配列において、アミノ酸残基はL-又はD-アミノ酸残基のいずれかを示し、好ましくはL-アミノ酸残基を示す。本発明の上記ペプチドは2個のシステイン残基を有しており、これらがジスルフィド結合することにより環状構造を形成する場合がある。本発明に用いるためのペプチドの範囲には、このような環状ペプチドも包含されることはいうまでもない。いかなる特定の理論に拘泥されるわけではないが、本発明に用いるためのペプチドが所望の生理活性を発現するためには上記の環状構造が必須である可能性があり、従って、その場合には上記の環状構造のペプチドは本発明における特に好ましい態様である。

また、上記アミノ酸配列において1若しくは2以上のアミノ酸残基による置換、挿入、及び／若しくは欠失が存在しており、かつ、NS3プロテアーゼに親和性を

有するペプチド、又は該ペプチドに含まれるシステイン残基から選ばれる2個のシステイン残基がジスルフィド結合した環状構造のペプチドも本発明により提供される。置換及び／又は挿入される1又は2以上のアミノ酸の種類は特に限定されないが、L-アミノ酸であることが好ましい。1又は2以上のアミノ酸残基による置換、挿入、及び／又は欠失が存在するペプチドが、実質的にNS3プロテアーゼ親和性を有しているか否かは、実施例に記載された方法に従って当業者が容易に確認することが可能である。

本発明のさらに別の態様によれば、上記の各ペプチド、又はそれらのペプチドを用いて本発明の方法により選択されるNS3プロテアーゼと相互作用する物質を有効成分として含む医薬、好ましくは上記の各ペプチド又は相互作用物質と製剤用添加物とを含む医薬組成物の形態の医薬が提供される。各ペプチド又は相互作用物質は、NS3プロテアーゼの活性を阻害できるため、前記医薬は、C型肝炎ウイルス感染増殖による肝臓細胞の異常に起因するヒトを含む哺乳類の疾患、とりわけ肝細胞の変性を伴う疾患の治療、予防、又は診断に有用である。このような疾患としては、例えば、肝硬変、肝臓ガンなどを挙げることができるが、これらに限定されることはない。

上記医薬において、上記の各ペプチドから選ばれる1又は2種以上のペプチドをそのまま用いてもよいが、通常は、製剤学的に許容しうる1又は2種以上の製剤用添加物を用いて上記ペプチドの1又は2種以上を有効成分として含む医薬組成物を製造し、上記の疾患の治療及び／又は予防のために用いることが好ましい。溶解度、吸収及び排泄などの体内動態、及び／又は製造方法などの観点から、上記ペプチドは生理学的に許容される塩の形態であってもよい。上記の医薬組成物の投与経路としては、例えば、静脈内投与、直腸内投与、経口投与などの全身投与の他、外用、点眼、点鼻、点耳、局所注射などの局所投与を挙げることができる。

例えば、静脈内投与用注射剤若しくは点滴剤などの全身投与剤は上記医薬組成物の好ましい形態である。有効成分をリボソームなどに封入した医薬組成物や抗体などを結合した医薬組成物を用いることにより、特定の標的器官に対する親和性や選択性を改善することができる場合がある。もっとも、投与経路は適用対象



となる疾患の種類、治療又は予防の目的、患者の状態などに応じて適宜選択可能であり、それぞれの投与経路に好適な製剤形態も適宜選択できることはいうまでもない。

## 実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

### 実施例1 ファージライブラリーの調製及びパニング法による特異的結合ファージペプチドの選択

本実施例は、ファージライブラリーを調製する方法、およびパニング法を使用してライブラリーをスクリーニングすることにより選択された蛋白質に指向結合するペプチドを発現するファージを同定する方法を示す。

#### <1>ランダムペプチド提示ベクターpSBSXの構築

一本鎖化抗体提示用ファージミドベクターpCANTAB5E（アマシャムファルマシア社より購入可能）を合成オリゴヌクレオチドを用いてランダムペプチド提示用ベクターに改変した。以下試薬、酵素は市販のものを用い、合成DNAプライマーは日本バイオサービスが作製したものをを用いた。下記の2種類のオリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、pCANTAB-5EベクターのNcoI、NotI部位に挿入することによりpSBSXベクターを作製した。

センス鎖：5'-CATGGCAGATCTTTAAGTCGACTCTAGAGGCCTCTGC-3'（配列番号13）

アンチセンス鎖：5'-GGCCGCAGAGGCCTCTAGAGTCTACTTAAAGATCTGC-3'（配列番号14）

#### <2>ベクターDNAの調製

上記で作製したベクター、pSBSXを材料として、西らの方法（実験医学，Vol.11, No.13, pp.1759-1764）、G. P. Smith らの方法（G. P. Smith ら、Science, Vol 249, pp.386-390, 1990）及びKoivunenら（前出、1995；Koivunenら、前出、1994bもまた参照のこと）によって記載された方法に基づいてファージランダムペプチドライブラリーを作製した。プラスミドpSBSXの調製は次の通りに行った。1 Lの2×YT-AG培地（100μg/mlアンピシリン、2%グルコースを含む2×YT培地）にpSBSXで形質転換した大腸菌XL2-Blueを植菌し、37℃で1晩振とう培養した。得られ

た菌体から、高純度のプラスミドを精製できるQIAGEN PLASMID MAXI KIT(QIAGEN社製)を用いてpSBSXを調製した。1L培養から約1.5mgのプラスミドが得られた。

次に、30 $\mu$ gのpSBSX DNAを NcoI、BglII、SalI、NotI(各120 units、宝酒造社製)で37°Cで約16時間消化した。反応液をフェノール／クロロホルム抽出及びクロロホルム抽出し、水相からDNAをエタノール沈殿させた後、得られたDNAを滅菌水に溶解した。プラスミドDNAはアガロース電気泳動およびセフラゲーション実験により、酵素消化が十分であることを確認した後、Sephacryl S-400 (アマシャムファルマシア社製)を用いて精製した。

### <3>ランダムペプチドをコードする縮重オリゴヌクレオチド

縮重オリゴヌクレオチド (degenerate oligonucleotides: ランダムなペプチドをコードするランダムなDNAの集合体) は、5末端ビオチン化プライマーを用いてPCRにより2本鎖化DNAを作製するSmithらの方法(前出)に従い、それぞれのライブラリーのためのオリゴヌクレオチドを作製した。よって、X<sub>6</sub>、X<sub>9</sub>、X<sub>15</sub>、CX<sub>4</sub>C、CX<sub>5</sub>C、CX<sub>6</sub>C、CX<sub>7</sub>C、CX<sub>8</sub>C、CX<sub>9</sub>CおよびCX<sub>12</sub>と称するペプチドをコードする10種類のライブラリーを調製した。ここで、「C」はシステインを示し、そして「X<sub>n</sub>」は、独立して選択されたアミノ酸が所定の数(n)連続していることを示す。これらのライブラリーは、少なくとも2つのシステイン残基がペプチド内に存在する場合、環状ペプチドを呈示し得る。オリゴヌクレオチドを、「C」がコドンTGTによってコードされ、そして「X<sub>n</sub>」が(NNK)<sub>n</sub>によってコードされるように構築した。ここで、「N」はA、C、G、およびTの等モル混合物であり、そしてここで、「K」はGおよびTの等モル混合物である。NNKにて表現されるDNAの集合は32組の組み合わせを含むことになるが、この32通りのなかに20種類すべてのアミノ酸のコドンが含まれる。このNNKを希望するアミノ酸の数だけ繰り返すことによって縮重オリゴヌクレオチドが合成される。

ペプチドは直鎖状に(unconstrained or linear form)提示されるだけでなく、2つのシステイン残基を配列の両端に配置することによりジスルフィド結合を形成させて、ループ構造を持つ形(constrained or loop form)で発現させることもできる。従って、CX<sub>5</sub>Cによって示されるペプチドは、配列TGT(NNK)<sub>5</sub>TGTを有するオリゴヌクレオチドによって表され得る。

5 $\mu$ gの5'末端ビオチン化合成オリゴヌクレオチド 5'-ACTCGGCCGACGGGGC-3' (配列番号15) と5 $\mu$ gの非標識の合成オリゴヌクレオチド 5'-TTCGGCCCCAGCGGCCCC-3' (配列番号16) とをプライマーとして用い、1 $\mu$ gの合成オリゴヌクレオチド 5'-ACTCGGCCGACGGGGCT(NNK)<sub>n</sub>GGGGCCGCTGGGGCCGAA-3 (n=4~15) (配列番号17) を鋳型としてPCR増幅を行い、二本鎖化した。PCRにはTaq DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を用い、添付の反応バッファーを使用した。1サイクルを、95℃で2.5分間、50℃で4分間、72℃で2.5分間とし、計5サイクルの増幅を行い、最後に72℃で5分間処理した。このPCR産物をエタノール沈殿させ、得られたDNAをNcoI、NotI (各200 units、宝酒造社製)を用いて37℃で16時間処理した。その後、ストレプトアビジン・アガロース (Streptavidin Agarose) (GIBCO BRL社製)を用いて、ビオチン化DNAフラグメントを除去し、溶液をフェノール/クロロホルム抽出及びクロロホルム抽出した後、DNAをイソプロパノール沈殿させた。得られたDNAを滅菌水に溶解してランダムインサートDNAとした。

#### <4>ファージミドベクターDNAとランダムインサートDNAのライゲーション

ランダムインサートDNAは、pSBSXベクター内の遺伝子III蛋白質をコードするDNAと連結し、遺伝子IIIの発現の際に、ランダムインサートDNAがコードするペプチドが遺伝子III蛋白質のN末端に融合蛋白質として存在するように設計した。<2>で得た7.45 $\mu$ gのNcoI、BglII、SalI、NotI切断pSBSX DNAと<3>で得た0.2 $\mu$ gのランダムインサートDNAとを、等容量のLigation High Mix (東洋紡社製)を用いて16℃で16時間ライゲーション反応を行った。反応液をフェノール/クロロホルム抽出及びクロロホルム抽出した後、DNAをエタノール沈殿させた。得られたDNAを滅菌水に溶解した後、ミリポアフィルターウルトラフリーC3(ミリポア社製; 商品名)を用いて限外濾過し、DNA濃度を5 $\mu$ g/ $\mu$ l以上に濃縮した。得られた溶液をファージランダムペプチドライブラリー作製に用いるまで-20℃で保存した。

#### <5>ファージディスプレイ・ランダムペプチドライブラリーの調製

大腸菌TG1株を用いたファージの調製は、アマシャムファルマシア社添付プロトコールに従った。大腸菌のトランスフォーメーションはエレクトロポレーション法により実施した。大腸菌のコンピテントセルは市販のエレクトロポレー

ション用TG1（アマシャムファルマシア社製）を用いた。必要量のコンピテントセルを氷上で解凍し、コンピテントセル200 $\mu$ lあたり、＜4＞で得たライゲーション反応液を2 $\mu$ l混合した。この混合液を、十分に冷やしたギャップ幅0.2cmのキュベット（BIO-RAD社製）に移し、Gene Pulser<sup>TM</sup>エレクトロポレーション装置（BIO-RAD社製）を用いて、2500V、200 $\Omega$ 、25 $\mu$ Fの条件下で電気パルス（4.5m秒）を与えた。処理後の大腸菌を、あらかじめ37°Cに保温しておいた9倍量のSOC培地（組成：バクトトリプトン20g/L、イーストエキストラクト5g/L、NaCl 0.5g/L、グルコース10g/L）に速やかに移し、37°Cで30分間振とう培養した。

20 $\mu$ g/mlアンピシリン（和光純薬社製）と50 $\mu$ g/mlのカナマイシン（和光純薬社製）を含むSOB寒天培地プレート（SOBAGプレート、組成：バクトトリプトン20g/L、イーストエキストラクト5g/L、NaCl 0.5g/L、10mM MgCl<sub>2</sub>、グルコース20g/L、バクタガー15g/L）に上記の培養液を適当に希釈した液をまき、37°Cで終夜静置培養した。プレート表面に形成されたコロニー数をカウントしてオリジナルのライブラリーサイズを求めた。このファージ培養液はトータルで約 $1 \times 10^9$ 個のクローンを含むと推定された。

#### ＜6＞ファージ粒子の回収

残りの培養液を、上記トランスフォーメーションの10回分ごとに37°Cに保温した200mlの2 $\times$ YT-AG培地に移し、M13K07ヘルパーファージをm.o.i.=10となるように加え、さらに37°Cで30分間、150rpmで振とうした。遠心（4°C, 3000rpm, 15分）により菌体を回収し、400mlの2 $\times$ YT-AK培地（100 $\mu$ g/mlアンピシリン、50 $\mu$ g/mlカナマイシンを含む2 $\times$ YT培地）に再懸濁して37°Cで1晩、150rpmで振とう培養した。遠心（4°C, 3000rpm, 30分）により培養液を回収し、このファージ培養液から、ポリエチレングリコール（PEG）沈殿を用いる方法で高濃度のファージを取得した。0.15倍量のPEG/NaCl溶液（20% PEG8000（W/V）/2.5M NaCl）を加え4°Cで1晩静置後、遠心（4°C, 16000rpm, 30分）により上清を除き、沈殿を0.1倍量のTBS（50mM Tris-HCl, 150mM NaCl）バッファーに懸濁、遠心（4°C, 16rpm, 15分）して上清を回収、もう一度0.15倍量のPEG/NaCl溶液でファージ粒子を沈殿させ、TBSバッファーに懸濁、ファージ液を最終的に約100倍に濃縮した。

#### ＜7＞ファージのタイターの測定

得られたファージのタイターを、以下に示すようにアンピシリン耐性ユニットであるt.u.(transducing unit)/mlで算出後、生体分子に結合するペプチドのスクリーニングに用いた。大腸菌TG1株のコロニーを5mlの2×YT培地で一晚培養した後、この培養液0.2mlを20mlの2×YT培地を用いて37°Cで約3時間培養した。この大腸菌培養液100 $\mu$ lと適当に希釈したファージ液2 $\mu$ lとをチューブ内で混合し、室温で10分間放置した。この混合液を40 $\mu$ g/mlアンピシリンを含むSOBAGプレートにまき、37°Cで終夜培養した。プレート上のコロニーを数え、プレートに1コロニー生じた時のファージのタイターを1 TU/mlとした。

#### < 8 > HCV NS3プロテアーゼ発現プラスミドの構築

HCV NS3プロテアーゼ活性を有する領域をコードするDNA断片(979番から1710番のアミノ酸まで含む)は、化学合成したオリゴヌクレオチドを2本鎖化して、順次連結することにより作製した。なお、HCVゲノム配列は、例えばHPCJCG(accession number D90208)としてGenBankに登録されており、いずれの配列情報も利用可能である。

つぎに、NS3プロテアーゼ活性を有する領域をコードするDNAを読み枠が一致するようにMBP融合蛋白質発現ベクターpMAL-c2(New England Biolabs社製)に導入し、NS3プロテアーゼ蛋白質発現用の組換えベクターを構築した。MBP融合蛋白質を発現する目的でpMAL細菌発現ベクターを使用することは当業者によく知られている。ついで、得られたDNAを塩化カルシウム法により大腸菌XL2-Blue株(Stratagene社製)に導入した。得られた形質転換体のうち、融合蛋白質が発現可能な形に挿入された株を選び出した。

#### < 9 > MBP-NS34aの大量発現および精製

MBP融合蛋白質の発現および精製は、前記発現ベクターに添付されたプロトコールに従って行った。100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地に生えた上記の通り作製した大腸菌株のコロニーを、50 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むLB培地200mlを入れた500ml容坂口フラスコ計5本(1リットル分)に直接植菌し、30°Cで14~16時間振とうし、OD<sub>600</sub>が0.5から0.7になるまで培養した。4°Cで冷却した後、終濃度0.5mMとなるようにIPTG(イソプロピルー $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド)を添加し、さらに20°Cで4時間振とう培養し、遠心により菌体を回収した。0.

85%のNaCl溶液で菌体を洗浄後、50mlのバッファーA (10mM Na-phosphate buffer(pH7.2), 30mM NaCl, 2mM DTT(dithiothreitol)) に懸濁し、凍結融解後、遠心により上清を回収した。回収した上清を70%硫酸沈殿に付し、遠心によりペレットを回収した。これをバッファーB(10mM Na-phosphate buffer(pH7.2), 30 mM NaCl, 10mM 2-ME(mercaptoethanol), 0.25% Tween 20)に懸濁し、4°Cで一晩放置したものを粗抽出液とした。次にバッファーBで平衡化したアミロースレジンカラム (径15mm、長さ10cm) に、0.5ml/分の速さでアプライし、これを数回繰り返した。

カラムの容量の4倍量のバッファーB、8倍量のバッファーC(10mM Na-phosphate buffer(pH7.8), 0.5M NaCl)でカラムを洗浄後、10mMのマルトースを含むバッファーCで溶出して精製酵素液を回収した。定量後、グリセロールを20%となるように添加し、使用するまで-80°Cにて保存した。1リットルの培養から約10mgの精製MBP-NS34aを得ることができた。

#### < 10 > MBP-NS34aのELISAによる定量

100 $\mu$ lのPBS(-) (2価金属イオンを含まないリン酸緩衝生理食塩水) 中の1.2 $\mu$ g/mlの希釈ヤギ抗MBP認識抗体 (New England Biolabs社製) をマイクロタイター平板ウェルに注入し、室温で8時間以上静置することにより、前記抗体でウェルを被覆した。200 $\mu$ lのPBS(-)でウェルを洗浄した後、200 $\mu$ lのPBS(-)中に溶解した1% BSA (ウシ血清アルブミン) をウェルに注入し、室温で8時間以上反応させてウェルをブロックした。ついで、200 $\mu$ lの0.05% Tween 20を含むPBS(-)でウェルを洗浄した後、100 $\mu$ lの精製MBP-NS34a溶液を加えて室温で2時間以上インキュベートした。

200 $\mu$ lの0.05% Tween 20を含むPBS(-)でウェルを洗浄した後、ウェルに100 $\mu$ lのPBS (-)で5万倍希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗MBP認識抗体 (New England Biolabs社製) を加えて室温で2時間以上インキュベートした。200 $\mu$ lの0.05% Tween 20を含むPBS(-)でウェルを洗浄した後、100 $\mu$ lのABTS (2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-sulfonic acid)) 溶液(アマシャムファルマシア社製)を加えて室温で5分間インキュベートした。100 $\mu$ lの1M NaOH (和光純薬社製)を加えて反応を停止した。反応液の光学密度を450nmで測定し、標準曲

線に対してMBP-NS34aをMBP当量として定量した。標準曲線は、20～300ng/mlの範囲にある既知濃度のMBP(New England Biolabs 社製)を用いて同様のELISAを行うことにより作成した。

## 実施例2 MBP-NS34a結合ファージのパニング法によるスクリーニング

パニング法は、基本的にSmithらの方法(Methods in Enzymology, Volume 217, pp.228-257)及びファルマシア社ファージディスプレイシステム添付プロトコールに従った。マルトースはMBP-NS34a蛋白質及びファージライブラリーに最終濃度10mMで加えた。

### <1>ポリスチレンチューブの標的蛋白質によるコーティング

パニングおよびELISAに用いる蛋白質(MBP-NS34a)溶液は、 $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で蛋白質コーティングバッファー(10mM  $\text{NaHCO}_3$ 緩衝液, pH9.6)により調製した。6ml容ポリスチレンチューブ(Falcon 2063)に約5mlの蛋白質溶液を満たし、PALM REACTION PR-12(NEWCO社製)上で4°Cで1晩被覆した。蛋白質溶液を除き、TBSバッファーで1回洗浄した後、約5mlのブロッキング溶液(5% BSAを含む10mM  $\text{NaHCO}_3$ 緩衝液)を満たし、4°Cで2時間、PALM REACTION PR-12で振とうした。ブロッキング溶液を除去し、TBST(0.5% Tween 20を含むTBS)バッファーで6回洗浄した後、1mg/ml (0.1%)BSA含有TBSTバッファーで調製した所定量のファージライブラリー( $\sim 2 \times 10^{12}$  TU)を加え、4°Cで1晩、PALM REACTION PR-12で振とうした。

### <2>ファージの洗浄、溶出

チューブからファージ液をピペットで除き、チューブのTBSTバッファーでの洗浄を10回繰り返した。4mlの溶出バッファー(0.1% BSAを含む0.1N グリシン-HCl, pH2.2)を満たし、PALM REACTION PR-12で15分間振とうすることにより、チューブに結合したファージを溶出させ、400 $\mu\text{l}$ の2M Tris溶液(pH無調整)で中和した。

### <3>ファージの再感染、レスキュー、回収ファージの測定

最少培地アガープレート上で生育させた大腸菌TG1株のコロニーの1個を5 mlのLB培地中で振とう培養器を用いて37°Cで一晩培養した。20 mlの2×YT中で、TG1培養液0.2mlを37°Cで約3時間振とう培養し、0.D.=約1.0の培養液に調製し、5分間室温で静置した。上記の<2>で回収した溶出ファージ液のうち半分量の2.

2mlと等量のTG1培養液を混合し、37°Cで15分間振とうした。一部をSOBAGプレートにストリークし、37°Cで1晩インキュベートし、回収されたファージクローン数の計算および配列解析用のテンプレート調製を行った。残りは遠心(4°C, 3000 rpm, 15分)により菌体を回収し、40mg/mlカナマイシン、40mg/mlアンピシリンを含む2×YT-AK培地に再懸濁し、37°Cで1晩振とう培養した。

同様に培養液をポリエチレングリコール沈殿して増幅ファージを回収した。遠心(4°C, 10000rpm, 10分)により培養液を回収し、0.15倍量のPEG/NaCl溶液を加え、4°Cで4時間以上静置後、再び遠心し(4°C, 10000rpm, 10分)、沈殿物を1mlのTBSバッファーに懸濁した。最後に遠心(4°C, 3000rpm, 15分)を行い、不溶物を吸わないように上清を1.5mlエッペンドルフチューブに回収した。ファージのタイターの測定法に従ってタイターを測定した。

上記操作<1>から<3>の操作を3~4回繰り返すことにより、MBP-NS34a結合ファージクローンを濃縮した。2回目以降の操作は、前回のスクリーニングでの回収ファージを増幅したファージ( $10^{11} \sim 10^{12}$  TU/ml)を用いて、<1>及び<2>に従って行った。濃縮したファージの中にはMBP-NS34aに親和性を示すペプチドを提示するファージが含まれており、そのペプチドはそれに相当するランダムDNAにコードされたものであると考えられる。

#### <4>MBP-NS34aに結合可能性のあるファージクローン及びファージDNA調製

前記<3>のSOBAGアガープレートで得られた大腸菌TG1のコロニーより、ファージクローン及び二本鎖DNAの調製を行った。得られたプレートのコロニーを40 µg/mlアンピシリンを含む2×YT-AG培地で一晚培養した。チューブに50 µlの培養液を移してファージの調製を、残り950 µlを用いてシーケンシングテンプレートの調製を、それぞれ行った。50 µlの培養液にm.o.i.=10となるようにM13K07ヘルパーファージを添加し、2×YT-AG培地も500 µl加えて37°Cで30分振とうした。遠心(4°C, 3000rpm, 15分)により菌体を回収し、1mlの2×YT-AK培地に再懸濁して、37°Cで1晩振とう培養した。翌日、遠心(4°C, 3000rpm, 15分)により培養液をエッペンドルフチューブに回収した。さらにファージの粒子数が少ないと思われる場合は0.15倍量のPEG/NaCl溶液を用いて濃縮したファージ液を調製した。このファージをMBP-NS34aに結合可能性のあるファージクローンとし、下記のELISA



法に従ってその結合性を測定した。シーケンシング用テンプレートDNAの調製はFlexi Prep Plasmid Extraction Kit（アマシャムファルマシア社製）を用い、添付のプロトコールに従って行った。

#### < 5 > ELISA法によるMBP-NS34a結合ファージの同定

96穴のマイクロタイタープレート（Maxisorp、Nunc社製）への蛋白質（MBP-NS34a）の固相化は1ウェルあたり50 $\mu$ lの溶液を用い、前述したパニング法と同様に実施した（4°Cで1晩、10mM NaHCO<sub>3</sub>バッファー、pH9.6、蛋白質濃度10 $\mu$ g/ml）。プレートのブロッキングもパニング法と同様に10mM NaHCO<sub>3</sub>で調製したBSA fraction Vの5mg/ml（0.5%）溶液を1ウェルあたり200 $\mu$ l注入し、4°Cで1時間放置して行った。TBSバッファーで1回リンスした後、< 4 >で調製したファージ液50 $\mu$ lをMBP-NS34aを固定したそれぞれのウェルに加え、4°Cで一晩インキュベートした。TBSバッファーで4回ウェルを洗浄し、5%スキムミルクを用いて2000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識したヒツジ抗M13ファージ抗体（アマシャムファルマシア社製：code No.27-9411-01）を1ウェルあたり50 $\mu$ l注入し、室温で1時間インキュベートした。

200 $\mu$ lの0.5% Tween20を含むTBSでウェルを5回洗浄した後、100 $\mu$ lの発色基質溶液（0.2mg/mlのABTSを含む50mMクエン酸、pH4.0：アマシャムファルマシア社製 code No.27-9402-01）を加えて室温でさらにインキュベートした。光学密度を96ウェルプレートリーダー（BIO-RAD社製）により405nmで測定し、MBP-NS34aの光学密度が、MBP-NS34aの代わりにMBPを用いたときの光学密度に比べて少なくとも2倍以上高いファージ溶液をMBP-NS34a結合ファージクローンとした。本発明により選択されたペプチドを有するファージのNS3プロテアーゼに対する親和性をELISA法で測定した結果を図1に示す。ネガティブコントロールとしては、ランダムペプチドを発現しないM13ファージを用いた。

#### < 6 > MBP-NS34a結合ファージクローンの塩基配列の解析

培養液950 $\mu$ lよりフレキシプレップキット（アマシャムファルマシア社製）を用いてプラスミドの調製を行った。< 4 >で取得したファージミドDNAのうち、上記のようにして同定されたファージに相当するDNAを2.5 $\mu$ l（約100ng）、ファージのランダムDNA領域から上流約60塩基の位置に結合するように作製したシーケン

シングプライマー5'-TGAATTTTCTGTATGGGG-3' (配列番号18) 1.6pmolを混合し、PRISM DNA CYCLE SEQUENCING KIT(PEバイオシステム社製)を用いて、添付のプロトコールに従い、PCR9600(Perkin-elmer社製)PCR装置によりサイクルシーケンシング反応を行った。反応終了後、エタノール沈殿により反応生成物を回収、ホルムアミドに溶解し、377型DNAシーケンサー(ABI社製)を用いてDNA塩基配列を決定、ファージのランダム領域のアミノ酸配列の解析を行った。そのアミノ酸配列及び出現頻度を表1に示す。

表1

クローン	アミノ酸配列		頻度
K13	CVPLVCIFRC	(配列番号1)	19
J94	CSRIVCLLWC	(配列番号2)	5
J93	CWLFLWC	(配列番号3)	3
N59	CWLLVFC	(配列番号4)	2
K5	CIAVIC	(配列番号5)	2
K25	CRPVMALFYC	(配列番号6)	2
N28	IWAVLWIWN	(配列番号7)	2
J95	WVFFWLSRP	(配列番号8)	1
K1	IWHFSFMWI	(配列番号9)	1
N50	CRLLVKVFWC	(配列番号10)	1
N51	GRRFGIVCTCLKYFV	(配列番号11)	1
N70	CALMSCLFWC	(配列番号12)	1

#### <7>合成ペプチドの作製

ファージペプチドライブラリーから得られたペプチドの配列は表1の通りであり、これらのペプチドは直鎖状構造、又は二個のシステイン残基がジスルフィド結合した分子内環状構造の二形態を取り得る。ペプチドの化学合成はサワディーテクノロジーに依頼した。直鎖状と環状の各種ペプチドを固相法で合成し、各々を逆相HPLCで80%以上の純度に精製した。

(液体クロマトグラフィーの条件)

カラム : Kromasil 100 C18, 5  $\mu$ m, 125×4 mm

温度 : 20°C

流速 : 0.75 ml/分

溶離液 : Buffer A: 0.1%トリフルオロ酢酸水溶液

溶媒 : 0.1% TFA(トリフルオロ酢酸)水溶液/アセトニトリル (20/80)

合成したペプチドはすべてマスマスペクトルで分子量を確認したものを評価に用いた。合成したペプチドの配列を表2に示す。

### 実施例3 合成ペプチドのプロテアーゼ阻害能の検討

#### <1>基質切断反応を指標としたNS3プロテアーゼ阻害活性試験

HCVのポリペプチド中のNS5a-NS5b間のNS3プロテアーゼ切断配列を合成し、アミノ末端をダンシル基で標識した合成基質をプロテアーゼと反応させ、逆相HPLCにより切断度を測定する垣内らの方法(Biochem. Biophys. Res. Commun., 210, 1059 (1995))に従い、合成ペプチドのプロテアーゼ阻害能の検討を行った。精製した1 $\mu$ gのMBP-NS34a、及び適当な濃度に調製した評価サンプルを含む反応液(50mM Tris-HCl(pH7.5), 30mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT)を25°Cで15分間インキュベートした。合成基質を50 $\mu$ Mの終濃度で添加し、37°Cで1～3時間反応させた。続いて反応容量の9倍量の反応停止液(20%アセトニトリル、0.1% TFA)を加えることにより、酵素反応を停止させ、逆相カラム(YMC-AM-302)で合成基質の切断ピークを検出(340nmで励起、510nmで測定)し、阻害剤添加時の切断率を算出した。さらにこの阻害剤添加の切断率を阻害剤を添加していないときの切断率で割った値を1から引き、100を掛けた値を評価薬剤の阻害率(%)とした。また、上記方法においてプロテアーゼ活性を50%阻害するときのペプチドの濃度(IC<sub>50</sub>)を算出した(表2)。

表 2

クローン	アミノ酸配列	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
K13	CVPLVCIFRC (配列番号1)	5
J94	CSRIVCLLWC (配列番号2)	5
J93	CWLFLWC (配列番号3)	3
N59	CWLLVFC (配列番号4)	3
J95	WVFFWLSRP (配列番号8)	15
K1	IWHFSFMWI (配列番号9)	15
N51	GRRFGIVCTCLKYFV (配列番号11)	7

その結果、上記合成ペプチドは、NS3プロテアーゼ活性阻害活性を持つことが示された。

#### < 2 > NS4aペプチド、4A18-40によるファージペプチドとMBP-NS34aの結合阻害

上記で得られたファージペプチドクローンと、NS3蛋白質に結合して活性化することが知られているウイルス由来のペプチドNS4aの作用部位が同一かあるいは重複する可能性を検討した。NS4aペプチドのアミノ末端から18番から40番の部分ペプチド(4A18-40ペプチドと称する)が、NS3プロテアーゼの活性を増強するのに最小限必要な領域として知られている(Tanjiら、J. Virol., 69, 4017-4026 (1995))。そこで、化学合成4A18-40ペプチド(LTTGSVVIVGRIILSGRPAVVPD)(配列番号19)を用いて、各ファージペプチドとMBP-NS34a蛋白質との結合への影響をファージELISA法により解析した。4A18-40ペプチドをモル比で10、20倍過剰に添加したMBP-NS34a蛋白質10 $\mu$ g/mlを96穴のマイクロタイタープレートの各ウェルに固相化した。プレートを10mM NaHCO<sub>3</sub>で調製した0.5% BSA溶液100 $\mu$ lを用いてブロッキングした後、200 $\mu$ lのTBSバッファーで1回リンスし、96穴プレートに実施例2< 4 >で調製したファージ溶液100 $\mu$ lをNS4aペプチドとMBP-NS34a蛋白質を固定化した各ウェルに加え、4°Cで一晩インキュベートした。200 $\mu$ lのTBSバッファーで4回ウェルを洗浄し、5%スキムミルクを用いて2000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識したヒツジ抗M13ファージ抗体を1ウェ

ルあたり50 $\mu$ l注入し、室温で1時間インキュベートした。

200 $\mu$ lの0.5% Tween20を含むTBSでウェルを5回洗浄した後、100 $\mu$ lのペルオキシダーゼ発色基質溶液を加えて、室温でさらにインキュベートした。96穴プレートリーダー(BIO-RAD社製)により光学密度405nmを測定し、NS4aペプチドの存在下において観察されるMBP-NS34aとファージペプチドの結合による光学密度を測定した。その結果、ファージクローンK13は4A18-40ペプチドの存在比が10倍、20倍と上昇するに従い、MBP-NS34a蛋白質への結合が阻害された(図2)。

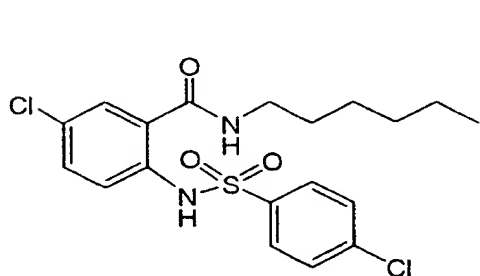
### <3>ファージペプチドとMBP-NS34aの結合阻害剤のスクリーニング

結合阻害剤のスクリーニングを上記のファージELISAシステムを用いて行った。スクリーニングに用いるペプチドはプロテアーゼ阻害活性が合成ペプチドで確認されたファージペプチドを、実施例2<3>の方法に従い、スクリーニングに必要な量調製した。96穴のマイクロタイタープレートの各ウェルを、10 $\mu$ g/mlに調製したMBP-NS34a蛋白質溶液50 $\mu$ lを用いて被覆した。プレートを10mM NaHCO<sub>3</sub>で調製した0.5% BSA溶液100 $\mu$ lを用いてブロッキングした後、200 $\mu$ lのTBSバッファで1回リンスし、96穴プレートに適当な濃度に希釈調製したケミカルライブラリー(自社合成)の化合物と、上記調製したファージを混合した溶液を作製し、この溶液100 $\mu$ lをMBP-NS34a蛋白質を被覆した各ウェルに加え、4°Cで一晩インキュベートした。200 $\mu$ lのTBSバッファで4回ウェルを洗浄し、5%スキムミルクを用いて2000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識したヒツジ抗M13ファージ抗体を1ウェルあたり50 $\mu$ l注入し、室温で1時間インキュベートした。

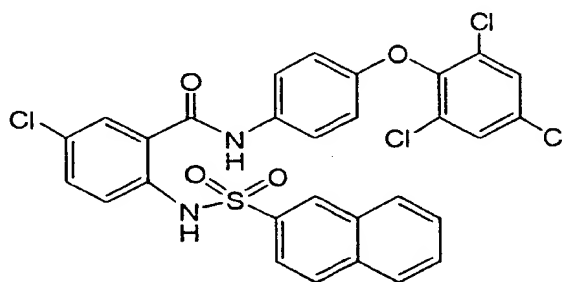
200 $\mu$ lの0.5% Tween 20を含むTBSでウェルを5回洗浄した後、100 $\mu$ lのABTS溶液を加えて、室温でさらにインキュベートした。96穴プレートリーダー(BIO-RAD社製)により光学密度405nmを測定し、化合物の非存在下において観察されるMBP-NS34aとファージペプチドの結合による光学密度よりも、化合物の存在下で光学密度が減少する化合物HCP1271(特開2000-7645号公報に記載の化合物5)が選択された。さらにこの阻害化合物を段階的に希釈し、NS3プロテアーゼ活性を阻害する他の5種類のファージペプチドそれぞれの結合に対する影響をファージELISA法を用いて同様に測定した結果、HCP1271は濃度依存的にMBP-NS34aとファージペプチドの結合を阻害した(図3)。また、実施例3<1>の方法に従い、この化

化合物のプロテアーゼ活性阻害能を測定した結果、HCP1271はNS3プロテアーゼの活性を $2.2\mu\text{M}$ の $\text{IC}_{50}$ 値で強く阻害した。さらにHCP1271の類似化合物HCP1231をケミカルライブラリーの検索から見いだしたので、NS3プロテアーゼ活性阻害能とファージペプチドとNS3プロテアーゼとの結合への影響を検討した。その結果、プロテアーゼ活性阻害活性は非常に弱く、ファージペプチドとNS3aとの結合もほとんど阻害しなかった（図4）。即ち、ファージペプチドとプロテアーゼ蛋白質の結合阻害剤のスクリーニングから得られた化合物は、非常に良くプロテアーゼ活性を阻害することができたことが示された。

化合物HCP1231及びHCP1271の構造式は以下の通りである。



HCP1231



HCP1271

#### 産業上の利用の可能性

本発明の方法は様々な生体成分、蛋白質-蛋白質、蛋白質-核酸等の相互作用を阻害する薬剤の簡便なスクリーニング手法として有用である。

本発明のペプチド化合物はHCVセリンプロテアーゼに親和性を有しており、C型肝炎ウイルス感染増殖による肝細胞の異常に起因する疾患、例えば肝硬変、肝臓ガンの予防・治療薬の有効成分として有用である。さらに本発明のスクリーニング方法は疾患の治療薬を探索する上で、蛋白質の機能をモジュレートしうる化合物の選択方法として有用である。

## 請求の範囲

1. 活性を有する生体分子の特定の領域に相互作用することによってその活性を調節する物質をスクリーニングする方法であって、以下の工程を含む方法：

(a) 多様なペプチドのうちの少なくとも一つを表面に提示する組換え生物の集合体からなるペプチドライブラリーから、前記生体分子と相互作用する組換え生物を選択する工程（但し、前記相互作用が抗原－抗体反応であるものを除く）、及び

(b) 選択された組換え生物又は該組換え生物が提示するペプチドと、前記生体分子との相互作用を阻害する物質を選択する工程。

2. 前記生体分子が蛋白質、核酸又は糖鎖である請求項 1 に記載の方法。

3. 前記ペプチドライブラリーが、ランダムペプチド提示ファージである請求項 1 に記載の方法。

4. 前記ペプチドライブラリーが、ランダムペプチド提示大腸菌である請求項 1 に記載の方法。

5. 前記ペプチドが 3 ～ 15 残基の長さである、請求項 1 に記載の方法。

6. 前記選択された組換え生物又は該組換え生物が提示するペプチドが、標識物質で標識されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



1/4

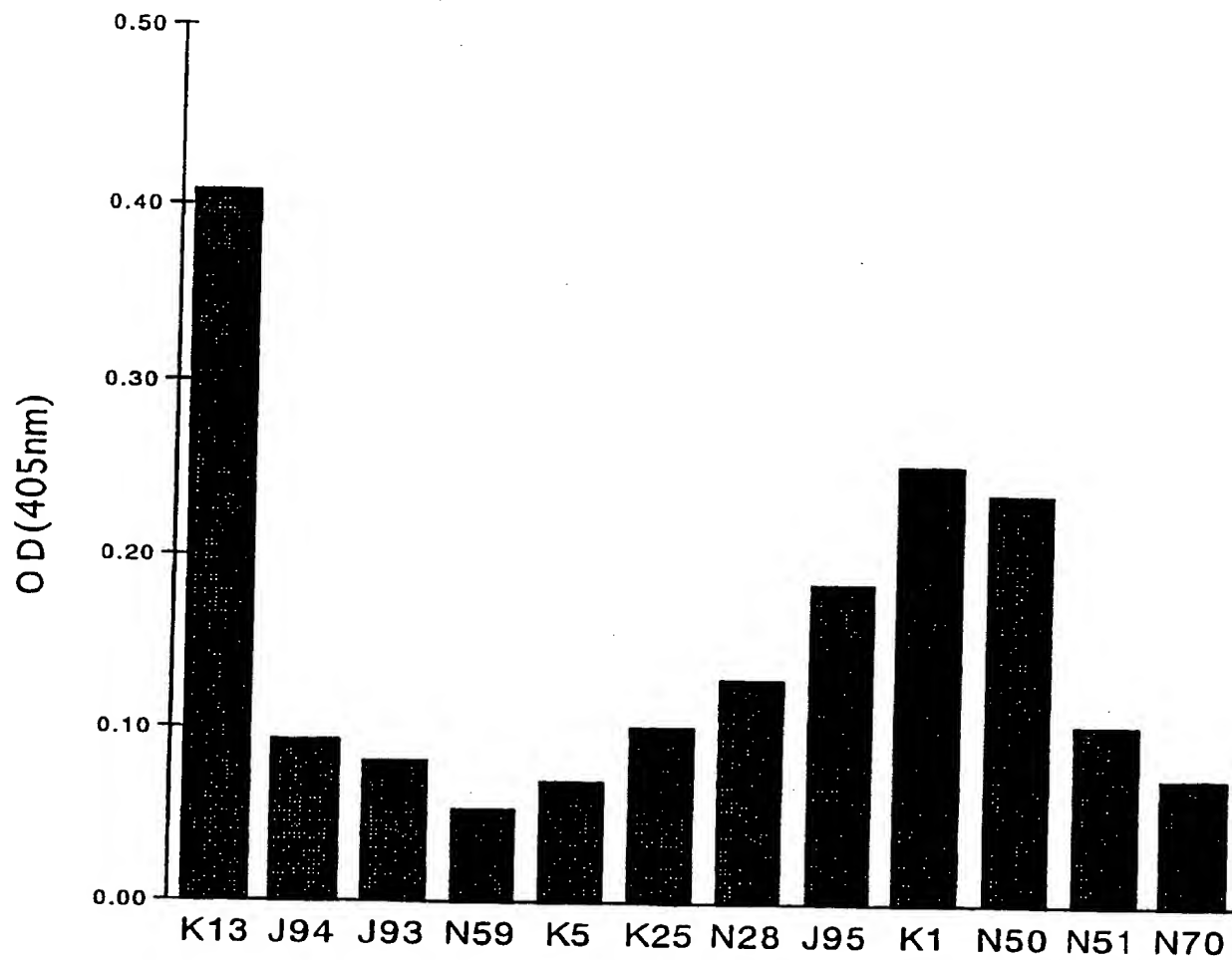


図 1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2/4

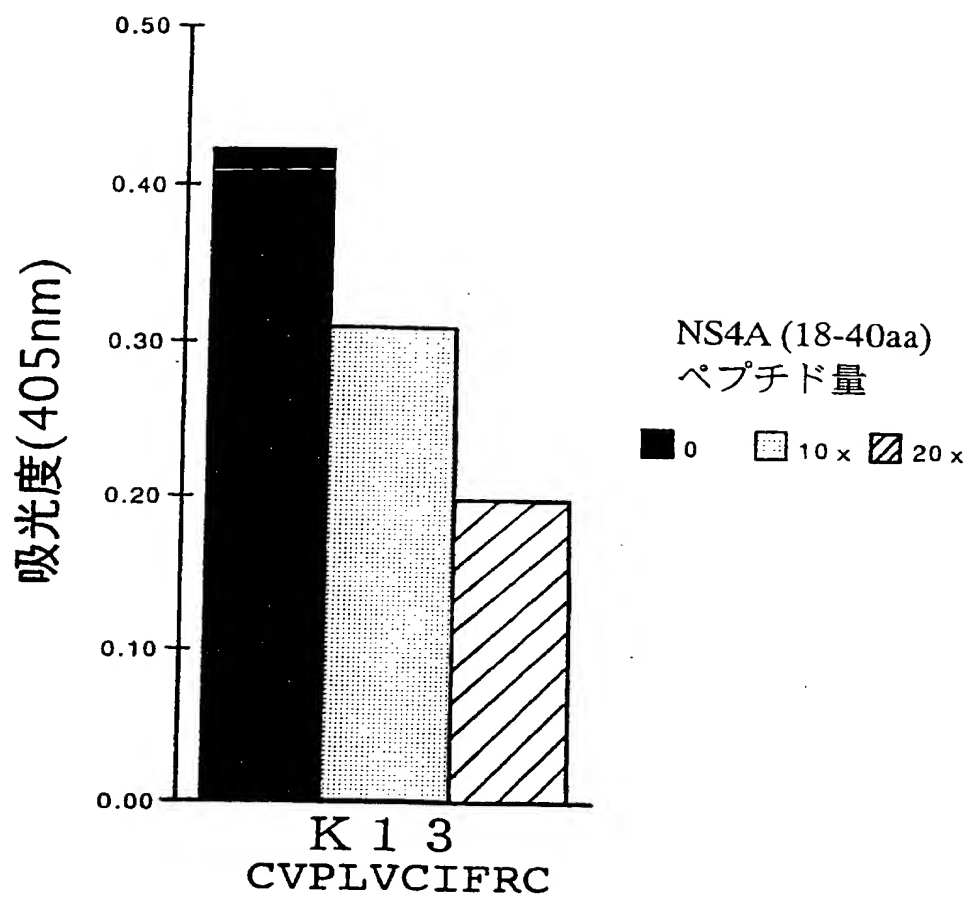


図 2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3/4

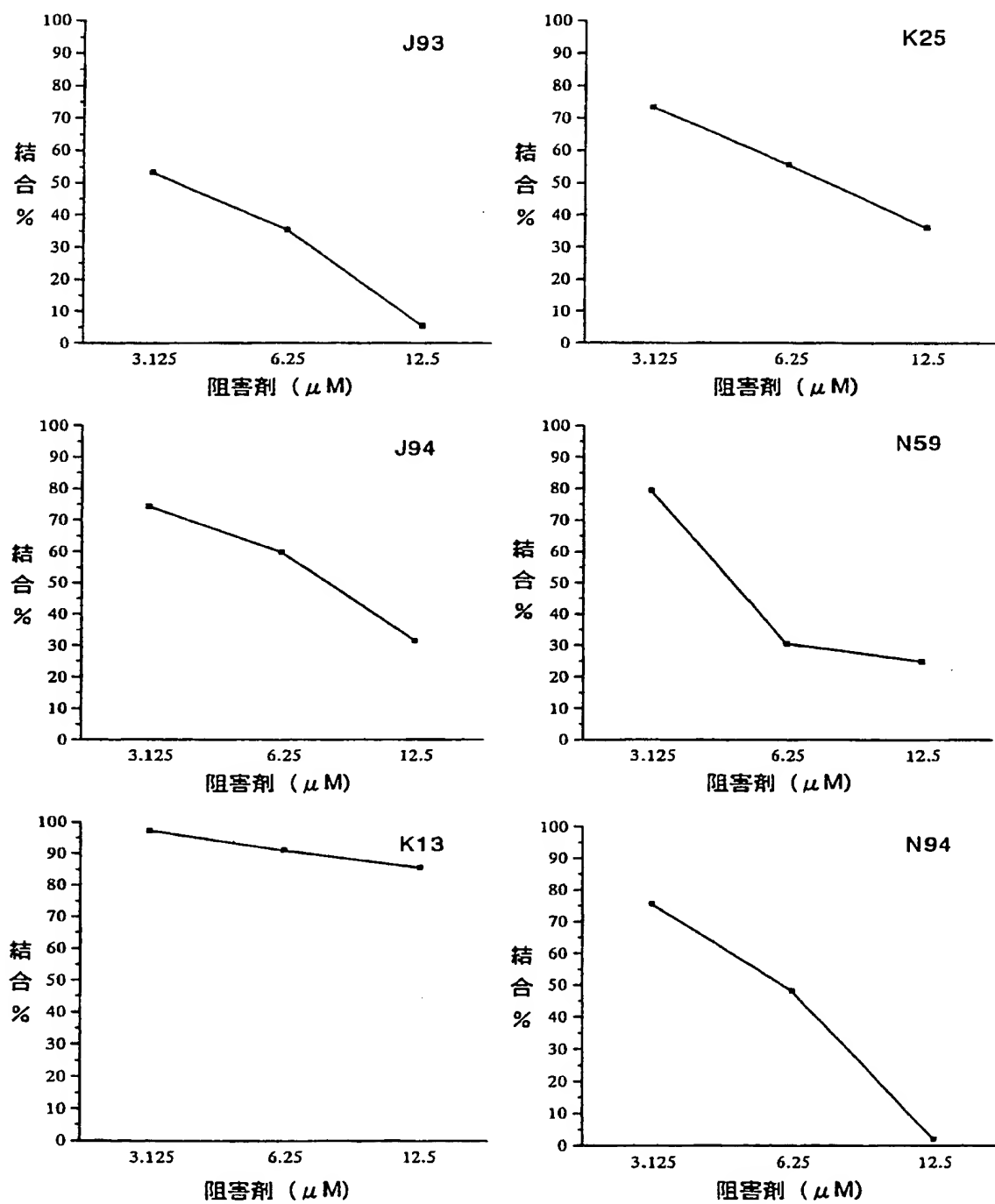


図 3

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4/4

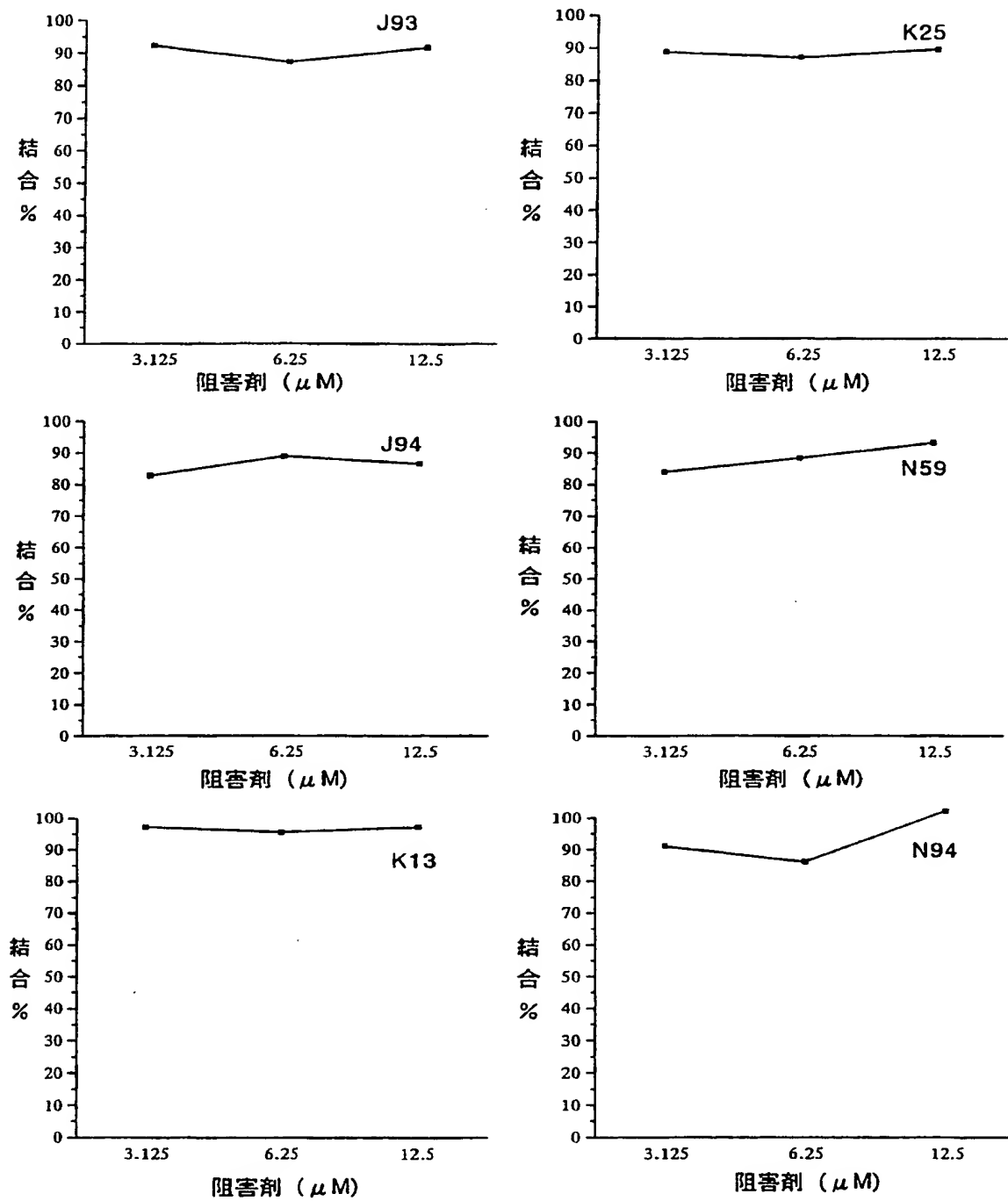


図 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)



1/6

## 配列表(SEQUENCE LISTING)

&lt;110&gt; 味の素株式会社(Ajinomoto Co., Inc.)

&lt;120&gt; 生体分子の活性調節物質のスクリーニング法

&lt;130&gt; B-585AYOP963

&lt;150&gt; JP 11-63110

&lt;151&gt; 1999-03-10

&lt;160&gt; 20

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: phage display peptide K13

&lt;400&gt; 1

Cys Val Pro Leu Val Cys Ile Phe Arg Cys

1

5

10

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: phage display peptide J94

&lt;400&gt; 2

Cys Ser Arg Ile Val Cys Leu Leu Trp Cys

1

5

10

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/6

<223> Description of Artificial Sequence: phage display peptide J93

<400> 3

Cys Trp Leu Phe Leu Trp Cys

1

5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: phage display peptide N59

<400> 4

Cys Trp Leu Leu Val Phe Cys

1

5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: phage display peptide K5

<400> 5

Cys Ile Ala Val Ile Cys

1

5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: phage display peptide K25

<400> 6

Cys Arg Pro Val Met Ala Leu Phe Tyr Cys

1

5

10

<210> 7

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3/6

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: phage display peptide N28

&lt;400&gt; 7

Ile Trp Ala Val Leu Trp Ile Trp Asn

1

5

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: phage display peptide J95

&lt;400&gt; 8

Trp Val Phe Phe Trp Leu Ser Arg Pro

1

5

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: phage display peptide K1

&lt;400&gt; 9

Ile Trp His Phe Ser Phe Met Trp Ile

1

5

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: phage display peptide N50

**THIS PAGE BLANK (uspro)**

4/6

&lt;400&gt; 10

Cys Arg Leu Leu Val Lys Val Phe Trp Cys  
1 5 10

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: phage display peptide N51

&lt;400&gt; 11

Gly Arg Arg Phe Gly Ile Val Cys Thr Cys Leu Lys Tyr Phe Val  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: phage display peptide N70

&lt;400&gt; 12

Cys Ala Leu Met Ser Cys Leu Phe Trp Cys  
1 5 10

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: primer

&lt;400&gt; 13

catggcagat ctttaagtcg actctagagg cctctgc

37

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



5/6

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: primer

&lt;400&gt; 14

ggccgcagag gcctctagag tctacttaaa gatctgc

37

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: primer

&lt;400&gt; 15

actcggccga cggggc

16

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: primer

&lt;400&gt; 16

ttcgccccca gcggcccc

18

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (18)

&lt;223&gt; n=(NNk)x (N=a or g or c or t, k=g or t, x=4 to 15)

&lt;400&gt; 17

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/6

actcgccga cgggctnng ggccgctggg gccgaa

36

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: primer

&lt;400&gt; 18

tgaattttct gtagggg

18

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic peptide 4A18-40

&lt;400&gt; 19

Leu Thr Thr Gly Ser Val Val Ile Val Gly Arg Ile Ile Leu Ser Gly

1

5

10

15

Arg Pro Ala Val Val Pro Asp

20

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: sequence of spacer

&lt;400&gt; 20

Gly Gly Gly Ser

1

THIS PAGE BLANK (user)

THIS PAGE BLANK (user)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01478

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> C12N 15/09, C12Q 1/00, C07K 4/00, C12Q 1/02, C12Q 1/70		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C12N 15/09, C12Q 1/00, C07K 4/00, C12Q 1/02, C12Q 1/70		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (DIALOG) , WPI (DIALOG)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GEORGE P.SMITH,et al. "[15]Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage", Methods in Enzymology(1993),Vol.217,p.228-257	1-6
X	CHRISTINE L.MARTENS,et al. "Peptides which bind to E-selectin and block neutrophil adhesion", The Journal of Biological, Chemistry(1995),Vol.270,No.36,p.21129-21136	1-6
X	D.W.S Wong,et al. "Identifying peptide ligands for barley $\alpha$ -amylase 1 using combinatorial phage display libraries", Journal of Agricultural and Food Chemistry(1998),Vol.46, No.9,p.3852-3857	1-6
X	MOUNIR DIOURI,et al. "New stimulation ligand of the Adenovirus 2 protease", Virology(1996), Vol.224,No.2,p.510-516	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 08 May, 2000 (08.05.00)		Date of mailing of the international search report 16.05.00
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01478

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KARYN T.O'NEIL, et al. "Identification of novel peptide antagonists for GPIIb/IIIa from a conformationally constrained phage peptide library", Proteins: structure, Function, and Genetics (1992), Vol.14, No.4, p.509-515	1-6
A	WO, 96/4557, A1 (DGI TECHNOLOGIES, INC.), 15 February, 1996 (15.02.96) & JP, 10-507517, A & EP, 774118, A1 & US, 6010861, A	1-6
A	Tooru NISHI et al., "Fuzzy Random Peptide Library no Tsukurikata to Ouyou", Jikken Igaku (1993), Vol.11, No.13, pp.1759-1764	1-6
A	JAMIE K.SCOTT, et al. "Searching for peptide ligands with an epitope library", Science (1990), Vol.249, No.4967, p.386-390	1-6

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/09, C12Q 1/00, C07K 4/00, C12Q 1/02, C12Q 1/70

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/09, C12Q 1/00, C07K 4/00, C12Q 1/02, C12Q 1/70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	GEORGE P. SMITH, et al. "[15] Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage", Methods in Enzymology(1993), Vol. 217, p. 228-257	1-6
X	CHRISTINE L. MARTENS, et al. "Peptides which bind to E-selectin and block neutrophil adhesion", The Journal of Biological Chemistry(1995), Vol. 270, No. 36, p. 21129-21136	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.05.00

国際調査報告の発送日

16.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

印

4 N 9 1 5 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	D. W. S Wong, et al. "Identifying peptide ligands for barley $\alpha$ -amylase 1 using combinatorial phage display libraries", Journal of Agricultural and Food Chemistry(1998), Vol. 46, No. 9, p. 3852-3857	1-6
X	MOUNIR DIOURI, et al. "New stimulation ligand of the Adenovirus 2 protease", Virology(1996), Vol. 224, No. 2, p. 510-516	1-6
X	KARYN T. O'NEIL, et al. "Identification of novel peptide antagonists for GPIIb/IIIa from a conformationally constrained phage peptide library", Proteins: structure, Function, and Genetics(1992), Vol. 14, No. 4, p. 509-515	1-6
A	WO, 96/4557, A1 (DGI TECHNOLOGIES, INC.) 15. 2月. 1996(15. 02. 96) & JP, 10-507517, A & EP, 774118, A1 & US, 6010861, A	1-6
A	西徹ら「ファージランダムペプチドライブラリーの作り方と応用」, 実験医学(1993), 第11巻, 第13号, 第1759-1764頁	1-6
A	JAMIE K. SCOTT, et al. "Searching for peptide ligands with an epitope library", Science(1990), Vol. 249, No. 4967, p. 386-390	1-6